

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

#2

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 12 MAR 2004	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 53 066.1

Anmeldetag: 07. November 2002

Anmelder/Inhaber: co.don Aktiengesellschaft, Teltow/DE

Bezeichnung: Gewerbeersatzstruktur, Verfahren zur Modifikation einer Gewebeläsion und Verwendung von vorgeformtem dreidimensionalem Gewebe als Lieferant von Botenstoffen und/oder Strukturbausteinen

IPC: C 12 N, A 61 D

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



ANWALTSKANZLEI
Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider
Patente Marken Design Lizenzen

Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstraße 15-17, 10117 Berlin

Patentanwälte
European Patent and Trademark Attorneys*

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.*
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing.³
Dr. Marlene K. Ziebig, Dipl.-Chem.²
Henry Schneider, Dipl.-Ing.*
Wilfried H. Goesch, Dipl.-Ing.*
Dieter K. Wicht, Dipl.-Ing.¹
Isolde U. Winkler, Dipl.-Ing.*
Dorit Rasch, Dipl.-Chem.*
Dr. Sven Lange, Dipl.-Biologe²
Stephan Mainitz, Dipl.-Chem.

Rechtsanwälte

Jörg K. Grzam
Marco Scheffler

Schützenstraße 15-17
D-10117 Berlin

Tel.: 030/206230 / 030/264 13 30
Fax: 030/264 18 38

office@berlin-patent.net
www.berlin-patent.net

Unser Zeich./our reference
P170902DE-La
Datum/date
Berlin, 07.11.2002

co.don AG
Warthestr. 21

14513 Teltow

**Gewebeersatzstruktur, Verfahren zur Modifikation einer
Gewebeläsion und Verwendung von vorgeformtem dreidimen-
sionalem Gewebe als Lieferant von Botenstoffen und/oder
Strukturbausteinen**

Gewebeersatzstruktur, Verfahren zur Modifikation einer Gewebeläsion und Verwendung von vorgeformtem dreidimensionalem Gewebe als Lieferant von Botenstoffen und/oder Strukturbausteinen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine neue Gewebeersatzstruktur und ein Verfahren zur Modifikation einer Gewebeläsion sowie die Verwendung von vorgeformten dreidimensionalen Gewebe als Lieferant von Botenstoffen und/oder Strukturbausteinen.

Hyalines Knorpelgewebe besteht aus einem einzigen Zelltyp, den Chondrozyten, die eine elastische extrazelluläre Matrix (EZM) synthetisieren. Die gesunde EZM setzt sich hauptsächlich aus Kollagenen und Proteoglykanen (PG) zusammen. Das im hyalinen Knorpel vorherrschende Kollagen ist vom Typ II, das sehr elastische Fasern bildet. Proteoglykane sorgen für eine Quervernetzung der kollagenen Fasern. Im gesunden Knorpel findet ein ständiger Umsatz von Matrixkomponenten statt, der wichtig für die gleichbleibende Elastizität des Knorpels ist (Mankin et al., 69 und 78).

Eine wichtige Funktion für den Stoffwechsel der EZM haben Enzyme und ihre Inhibitoren (Vincenti et al., 94). Als Enzyme im Knorpel wirksam sind Metalloproteinasen (MMPs), die einen Abbau von Kollagenen und Proteoglykanen katalysieren (Cawston 95 und 98). Die Aktivität dieser Enzyme wird über Inhibitoren (Tissue inhibitors of Metalloproteinases: TIMPs) reguliert (Cawston 95 und 98), die ebenfalls im Knorpel synthetisiert werden (Su et al., 99, Zafarulla et

al., 96). Ein Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs ist entscheidend für den Erhalt der Knorpelmatrix (Dean et al., 89, Martel Pelletier et al., 94).

Cytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Synthese von Strukturkomponenten der Knorpelmatrix und von degradierenden Enzymen sowie deren Inhibitoren (Pelletier et al., 93, Westacott et al., 96). Im gesunden Knorpel herrscht ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Neusynthese von Matrixkomponenten und damit auch zwischen der Expression von Cytokinen und Wachstumsfaktoren, das entscheidend für den Erhalt der Elastizität des Knorpels ist und eine ständige Erneuerung der „verbrauchten“ Strukturkomponenten gewährleistet. Eine verstärkte Präsenz von Wachstumsfaktoren im Gelenk kann die Regenerationsfähigkeit von Knorpel *in vivo* unterstützen (Glansbeek et al., 1998, van Breuningen et al. 1998).

Die wichtigsten für den Knorpel bekannten anabolen Wachstumsfaktoren stellen Transforming-Growth-Factor β (TGF β) (Lafeber et al., 93), Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) (Guerne et al., 94), Fibroblast-Growth-Factor 2 (FGF2; früher basic (b) FGF) (Guerne et al., 94), Insulin-Like-Growth-Factor (IGF) (Schalkwijk et al., 89) und die Bone-Morphogenetic-Proteins (BMPs) (Lietman et al., 97, Klein-Nulend et al., 98) dar. TGF β , IGF I und BMP-2 werden als wichtigste Faktoren für eine Förderung der Knorpelreifung angesehen (van Susante et al. 2000, Martin et al. 1999, Valcourt et al. 1999, van Osch et al. 1998, Sailor et al. 1996).

Sowohl PDGF, als auch IGF stimulieren das Wachstum von humanen Chondrozyten (Guerne et al., 94, Kieswetter et al., 97). IGF I ist der dominante Wachstumsfaktor im adulten Gewebe (Vetter et al., 86) und fördert die PG-Synthese und hemmt den Abbau von Knorpelmatrix (Schalkwijk et al., 89, Hardingham et al., 92, Schäfer et al., 93), selbst nach ei-

ner Stimulation mit dem Knorpel-degradierenden Zytokin IL-1 β (Neidel et al., 94).

TGF β ₁ hat im Knorpelstoffwechsel eine anabole Wirkung, da er die Expression von TIMP (Günther et al., 94, Zafarulla et al., 96), die PG- (Hardingham et al., 92, Lotz et al., 95) und Kollagen-Synthese (Redini et al., 88) stimuliert und das Wachstum von Chondrozyten fördert (Battegay et al., 90, Frazer et al., 94, Guerne et al., 95). Zusätzlich verstärkt TGF β ₁ die Knorpel-regenerierende Wirkung von PDGF und IGF (Mankin et al., 91).

FGF 2 stimuliert die Proliferation von kultivierten Chondrozyten und hat in Kombination mit TGF β eine synergistische Wirkung (Okazaki et al. 1996), eine Stimulierung der Matrixsynthese durch FGF ist ebenfalls nachzuweisen (Sah et al., 1995).

BMPs regen die Proteoglykansynthese in Chondrozyten an (Huch et al. 1997) und unterstützen die Differenzierung von Vorläufer Zellen (z. B. aus dem Periost oder Knochenmark) zu reifen Chondrozyten (Denker et al. 1999, Klein-Nulend et al. 1998). Insgesamt treiben sie die Differenzierung von Chondrozyten voran und unterstützen damit die Knorpelheilung (Leboy et al., 1997)

Der Wirkmechanismus der von Brittberg und Peterson entwickelten klassischen ACT-Technik beruht auf der Fähigkeit autologer, in Monolayer vermehrter Chondrozyten *in vivo* ein hyalines bzw. hyalinähnliches Regenerat zu bilden, das dem umgebenden hyalinen Gelenkknorpel gleicht und damit eine funktionelle Regeneration von Knorpel-Läsionen darstellt (Brittberg et al. 1994).

Zur Behandlung der Patienten ist es notwendig, eine geringe Anzahl an Chondrozyten, die aus einer kleinen Biopsie gewonnen werden, in Monolayer-Kultur zu vermehren. Dabei nehmen die Chondrozyten die typische Form mesenchymaler Zellen

an und ändern im Vergleich zur *in situ*-Situation ihr Expressionsmuster (Schnabel et al. 2002; Stokes et al. 2002, Velikonja et al. 2002, Robinson et al. 2001). Die Fähigkeit von Chondrozyten, nach einer Vermehrung in Monolayer und anschließender Überführung in 3D-Kultur erneut die Marker hyalinen Knorpels zu exprimieren, wurde jedoch *in vitro* bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen (Benya et al. 1982, Lemare et al. 1998, Binette et al. 1998, Hendrickson et al. 1994, Robinson et al. 2001). An einem speziell entwickelten Zellkultur-System konnte auch gezeigt werden, dass rein autolog in Monolayer vermehrte Chondrozyten - ohne den Zusatz von Periost oder Wachstumsfaktoren - nach einer Überführung in eine 3D-Kultur ohne Träger Kollagen II und S-100 als Knorpelmarker reexprimieren (Anderer et al. 2002, Schlegel et al. 2002). Die Injektion von Wachstumsfaktoren fördert und verstärkt in verschiedenen Zellkultursystemen die Synthese von spezifischen Knorpelmarkern (Martin et al. 1999, van Osch et al. 2001, Worster et al. 2001, Izzo et al. 2002, Jakob et al. 2001) und beschleunigt eine Heilung von Knorpeldefekten in Tiermodellen (Weisser et al. 2002, Lee et al. 2001, Hunziker et al. 2001, Perka et al. 2000). Daher kann man davon ausgehen, dass *in vivo* nach der Durchführung einer ACT die selben Mechanismen wirksam werden (Dell'Accio et al. 2001). Nach Applikation in den durch Periost oder Kollagenmaterial geschaffenen dreidimensionalen Raum im Gelenk zeigen die Chondrozyten wieder ihr *in vivo* Expressionsmuster und regenerieren hyalinen Knorpel mit einer deutlichen Expression von Kollagen Typ II (Schlegel et al. 2002). Dies wurde anhand von Biopsien, die Patienten nach Durchführung einer ACT entnommen wurden, bestätigt (Peterson et al. 2002A und B, Philippou et al. 2002, Brittberg et al. 2001, Roberts et al. 2001, Peterson et al. 2000B, Richardson et al. 1999, Minas et al. 1999). *In vitro* konnte bereits nachgewiesen werden, dass durch kultiviertes Periost Wachstumsfaktoren wie TGF β , IGF I und BMP-2 sekre-

tiert werden (O'Driscoll et al. 2001A, Raab-Cullen et al. 1994), und somit die Regeneration des hyalinen Knorpels durch die im Rahmen der ACT injizierte Chondrozyten fördern können.

In weiteren *in vitro* Experimenten mit Gelenkknorpel verschiedener Spezies wurde gezeigt, dass sich Chondrozyten, die in einer Zellsuspension auf die Knorpeloberfläche aufgebracht werden, stabil mit dem nativen Gewebe verbinden (Doherty et al. 2000). So kommt es zu einer stabilen und langfristigen Integration des nach ACT neugebildeten Knorpels in den nativen Umgebungsknorpel.

Beim normalen Gebrauch der Gelenke ist der sie überziehende hyaline Gelenkknorpel enorm hohen Druckbelastungen ausgesetzt und Schädigungen seiner Struktur oder Verletzungen haben große Auswirkungen auf die gesamte Funktionalität des Systems.

Die natürliche Regenerationskapazität des Gelenkknorpels ist sehr gering (Hunter et al. 1993, Buckwalter et al. 1990, Steinwachs et al. 1999, Brittberg et al. 1999, Martinek et al. 2001). Im gesunden erwachsenen Knorpel teilen sich die Chondrozyten normalerweise nicht mehr (Mankin 64). Lediglich Gelenkknorpeldefekte, bei denen die subchondrale Knochenplatte beschädigt wird, besitzen aufgrund des Einwanderns von Stammzellen aus dem Markraum eine gewisse Kapazität zur Reparatur (O'Driscoll et al. 1998). Dagegen haben oberflächliche chondrale Defekte mit intakter subchondraler Knochenplatte praktisch keine Kapazität zur Selbstregeneration (Hunter et al. 1993, Mueller & Kohn 2000, Buckwalter 2000).

Ist der Knorpel einmal geschädigt, weitert sich die Degeneration aufgrund einer Stimulierung von knorpeldegradierenden Einflüssen kontinuierlich aus (Lohmander et al. 1994a, Lohmander et al. 1994b, Lohmander et al. 1996, Kuhne et al.

1998, Lohmander et al. 1999). Daher besteht nach einer Verletzung des Knorpels für die betroffenen Patienten ein deutlich erhöhtes Arthroserisiko, was letztendlich häufig den Einsatz einer Gelenkendoprothese nötig macht. Dies wurde bereits durch verschiedene prospektive und retrospektiven Studien nachgewiesen (Gelber et al. 2000, Roos et al. 1998, Maletius et al. 1996, Messner et al. 1996, Kohatsu et al. 1990, Hunter et al. 2002).

Bisher konnte durch die Behandlung von Knorpeldefekten durch die Methode der klassischen ACT eine Wiederherstellung der verschiedenen mechanischen Eigenschaften, wie Elastizität, Stabilität und Gleitfähigkeit des Knorpels, sowie dessen hyaline bzw. hyalinähnliche Regeneration (Peterson et al. 1998, Buckwalter et al. 1996) erreicht werden. Vor allem die Gewährleistung von langfristiger Schmerzfreiheit und Gelenkbeweglichkeit durch den neugebildeten Gelenkknorpel (Johnstone & Yoo 1999) ist durch die ACT gegeben. Das entstehende Knorpelregenerat besitzt die gleichen mechanischen Eigenschaften wie gesunder Gelenkknorpel (Peterson et al. 2002A und 1998), der durch knorpelspezifische Kollagen-II-Expression charakterisiert ist (Minas et al. 1999, Roberts et al. 2001, Peterson et al. 2000A, Peterson et al. 2002A, Mahroof et al. 2002). Somit wird durch das neugebildete Gewebe das Risiko einer Arthroseentstehung verringert und der Patient vor einer Endoprothetik bewahrt.

Aufgabe der Erfindung war es daher, eine Gewebeersatzstruktur, insbesondere eine Knorpelersatzstruktur, und ein Verfahren zur Behandlung bzw. Modifikation von Gewebeläsionen bereitzustellen, das eine einfache, sichere und effiziente Behandlung von Gewebedefekten ermöglicht.

Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung einer Gewebeersatzstruktur, die

- (a) eine autologe Gewebezellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen

und

- (b) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,

umfasst.

Weiterhin betrifft die Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform die Bereitstellung einer Knorpelersatzstruktur, wobei diese

- (a) eine autologe Knorpelzellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Verwendung von wachstumsfördernden Verbindungen

und

- (b) ein vorgeformtes dreidimensionales Knorpelgewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Knorpelzellen, Knochenzellen, oder mesenchymale Stammzellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, das zu mindestens 40 Vol.% extrazelluläre Matrix beinhaltet, in welche differenzierte

Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,

umfasst.

Bevorzugt ist, dass die Gewebeersatzstruktur eine Muskelerersatzstruktur, insbesondere eine glatte Herzmuskelerersatzstruktur oder eine Knochenersatzstruktur ist.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Modifikation einer Gewebeläsion, bei dem in die Gewebeläsion

- (a) eine autologe Zellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen

und

- (b) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,

einggebracht werden.

Die Erfindung betrifft in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Modifikation einer Knorpelläsion, bei dem in die Knorpelläsion

- (a) eine autologe Knorpelzellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen

und

- (b) ein vorgeformtes dreidimensionales Knorpelgewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Knorpelzellen, Knochenzellen, oder mesenchymale Stammzellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, das zu mindestens 40 Vol.% extrazelluläre Matrix beinhaltet, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,

einggebracht werden.

Bevorzugt ist die Gewebeläsion eine Knochen-, Knorpel- und/oder Muskelläsion.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die natürliche Wirkung von Wachstumsfaktoren, die eine Regeneration von Knorpel unterstützen, genutzt, um die Behandlung des Defektes, insbesondere gegenüber der klassischen Therapie zu beschleunigen. Mit Hilfe des dreidimensionalen Gewebes, insbesondere Knorpelgewebes, ist es möglich, eine Expression von völlig natürlichen autologen Wachstumsfaktoren direkt im behandelten Defekt zu erreichen und damit die Bildung eines funktionsfähigen Regenerates zu beschleunigen.

Im Rahmen einer Behandlung der Modifikation einer Gewebeläsion, insbesondere einer Knorpelläsion, werden demgemäß neben einer autologen Knorpelzellsuspension auch ein vorgeformtes dreidimensionales Knorpelgewebe appliziert, wobei das dreidimensionale Knorpelgewebe die für die Stimulation der Matrixsynthese notwendigen Wachstumsfaktoren synthetisiert, wodurch die Heilung bzw. Modifikation des behandelten Gewebeschadens, wie z.B. des Knorpelschadens, unter-

stützt wird. Die gemeinsam mit dem dreidimensionalen Knorpelgewebe, welche auch als 3D Konstrukte bezeichnet werden können, eingebrachten Zellen der Knorpelsuspension garantieren, dass eine optimale Integration des entstehenden Regenerates, insbesondere in den Umgebungsknorpel erfolgt. Durch die von dem dreidimensionalen Gewebe synthetisierten Wachstumsfaktoren wird z.B. die Matrixbildung der Suspensionszellen verstärkt angeregt und damit die Heilung des Defektes beschleunigt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere deshalb vorteilhaft, da unter völlig autologen Bedingungen, d.h., ohne den Zusatz von Stoffen, die nicht vom Patienten selbst stammen, bereits in vitro ein dreidimensionales Knorpelgewebe vorgeformt wurde, das in seinen Eigenschaften nativem Knorpel sehr ähnlich ist und damit sofort nach der Operation die Grundlage für den weiteren Aufbau von Knorpelsubstanz schafft.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die aufwendige Applikation des Periostlappens gemäß den bekannten Verfahren damit umgangen werden kann, da die durch das Periost sezernierten Wachstumsfaktoren, die in dem bekannten Verfahren essentiell für den Wirkmechanismus sind, in dem erfindungsgemäßen Verfahren durch das vorgeformte dreidimensionale Knorpelgewebe bereitgestellt werden. Es konnte erfindungsgemäß nachgewiesen werden, dass die vorgeformten dreidimensionalen Knorpelgewebe in der Lage sind, bereits in vitro eine hyaline Knorpelmatrix zu bilden. Insbesondere Kollagen II, als das charakteristische Protein hyalinen Gelenkknorpels, wird durch die vorgeformtes dreidimensionalen Knorpelgewebe in großen Mengen gebildet und vor allem werden die Wachstumsfaktoren zu diesem Zeitpunkt der Transplantation bereits aktiv hergestellt.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird nach dem Einbringen der Knorpelzellsuspension und des Knorpelgewebes die Läsion mit einer Membran abgedeckt.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von aus einem menschlichen oder tierischen Organismus gewonnenen Knorpelzellen, Muskelzellen, Knochenzellen, oder mesenchymale Stammzellen, die in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, das insbesondere zu mindestens 40 Vol.% extrazelluläre Matrix beinhaltet, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind, als Lieferant von Botenstoffen, Struktur-, Gerüst- und/oder Matrixbausteinen, insbesondere Wachstumsfaktoren und/oder Cytokinen.

Durch die Verwendung von gewonnenen Knorpelzellen als Quelle von regenerationsfördernden Wachstumsfaktoren und bereits vorgeformter hyaliner Knorpelmatrix kann eine bedeutend schnellere Heilung von Knorpeldefekten erreicht werden als dies mit bisher bekannten Methoden möglich ist. Ein wesentlicher Vorteil, den die Verwendung - in vivo oder in vitro - neben der schnellen Wirksamkeit bietet, ist die Tatsache, das der Patient rein autolog behandelt werden kann und so das Risiko einer Abwehrreaktion auf das eingebrachte Transplantat ausgeschlossen werden kann.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Verwendung in vivo oder in vitro.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verwendung zur Behandlung einer Gewebeläsion, bevorzugt einer Knorpel-, Knochen- und/oder Muskelläsion.

Die Erfindung betrifft also eine Gewebeersatzstruktur und ein Verfahren zur Modifikation bzw. Behandlung von Gewebe-

läsionen, beispielsweise von Knorpelläsionen, mit ausschließlich körpereigenem dreidimensionalen gezüchteten Knorpel in Form sogenannter Spheroide; hiermit ist beispielsweise die Wiederherstellung von degenerierten Arthroseknorpel möglich. Mit Hilfe dieser Spheroidtechnologie bzw. der Spheroide wird eine Plattformtechnologie für weitreichende weitere Produktinnovationen bereitgestellt, womit die körpereigene Zellregeneration von traumatisch bedingten Gelenk-Knorpelschäden möglich ist. Dieser Einsatz von patienteneigenen, durch Spheroide produzierten Wachstumsfaktoren führt zu einer wesentlich schnelleren Ausbildung von druckstabilem Gelenkknorpel. Erreicht wird dies insbesondere durch gezieltes monospezifisches Heranwachsen von Knorpel, wodurch eine minimal invasive, arthroskopische autologe Chondrozytentransplantationsbehandlung möglich ist. Insbesondere werden hierdurch die Krankenhaus- und Rehabilitationszeiten signifikant vermindert. Ebenfalls vermindert werden die Kosten und es wird eine schnellere Wiederherstellung des behandelten Patienten erreicht. Diese Spheroidtechnologie ist selbstverständlich nicht auf Knorpel beschränkt, sondern kann zur Regeneration von allen menschlichen Geweben eingesetzt werden.

Patentansprüche

1. Gewebeersatzstruktur,
dadurch gekennzeichnet, dass sie
 - (a) eine autologe Gewebezellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungenund
 - (b) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,umfasst.
2. Knorpelersatzstruktur,
dadurch gekennzeichnet, dass
 - (a) eine autologe Knorpelzellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungenund
 - (b) ein vorgeformtes dreidimensionales Knorpelgewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen

oder tierischen Organismus Knorpelzellen, Knochenzellen, oder mesenchymale Stammzellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, das zu mindestens 40 Vol.% extrazelluläre Matrix beinhaltet, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,

umfasst.

3. Gewebeersatzstruktur nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Muskulaturersatzstruktur, insbesondere eine glatte Herzmuskulaturersatzstruktur oder eine Knochenersatzstruktur ist.
4. Verfahren zur Modifikation einer Gewebeläsion, dadurch gekennzeichnet, dass in die Gewebeläsion
 - (a) eine autologe Zellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen
 und
 - (b) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensi-

onskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind, eingebracht werden.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Gewebeläsion eine Knochen-, Knorpel- und/oder Muskelläsion ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass in die Knorpelläsion

(a) eine autologe Knorpelzellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen

und

(b) ein vorgeformtes dreidimensionales Knorpelgewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Knorpelzellen, Knochenzellen, oder mesenchymale Stammzellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, das zu mindestens 40 Vol.% extrazelluläre Matrix beinhaltet, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem

proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,
eingebracht werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, dass
nach Einbringen der Knorpelzellsuspension und des Knorpelgewebes die Läsion mit einer Membran abgedeckt wird.
8. Verwendung von aus einem menschlichen oder tierischen Organismus gewonnenen Knorpelzellen, Muskelzellen, Knochenzellen, oder mesenchymale Stammzellen, die in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind, als Lieferant von intrazellulären Botenstoffen, Struktur-, Gerüst- und/oder Matrixbausteinen.
9. Verwendung nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, dass
die intrazellulären Botenstoffe Wachstumsfaktoren und/oder Cytokinen sind.
10. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9 in vivo oder in vitro.

11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 8 bis 10 zur Behandlung einer Gewebeläsion.

12. Verwendung nach Anspruch 11
dadurch gekennzeichnet, dass
die Gewebeläsion eine Knorpel-, Knochen- und/oder Muskelläsion ist.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Gewebeersatzstruktur, die

(a) eine autologe Gewebezellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen und

(b) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind, umfasst.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.